

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-66307

(P2001-66307A)

(43) 公開日 平成13年3月16日 (2001.3.16)

(51) Int. CL.	識別記号	F I	7-72-J* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	W 2 G 0 4 B
33/92		33/92	Z

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平11-244410

(22) 出願日 平成11年8月31日 (1999.8.31)

(71) 出願人 000141875

株式会社いかがく

京都府京都市伏見区羽東岡古川町328番地

(72) 発明者 内田 竜夫

京都府京都市伏見区羽東岡古川町328番地

株式会社いかがく内

(72) 発明者 貞策 新一

京都府京都市伏見区羽東岡古川町328番地

株式会社いかがく内

(74) 代理人 100086316

弁理士 堀島 三雄 (外2名)

P ターム (参考) 2G045 AA13 AA25 BB52 CA25 CA26

DA62 DA63 DA64 DA65 DA66

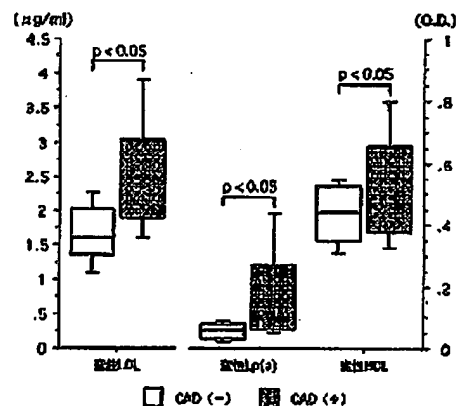
FB01 FB03 FB06 FB07

(54) 【発明の名称】 血液中の変性リポ蛋白の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展と深く関わる、各種変性リポ蛋白の新規な検出方法を提供する。

【解決手段】 LDL, HDL, VLDL, IDL, Lp(a), LDL (small, dense LDL) などのリポ蛋白が変性されてなる各種変性リポ蛋白と、他の血漿蛋白との複合体を測定対象にして血液中の変性リポ蛋白を検出する。



動脈硬化症における血中の変性 (LDL, Lp(a), HDL) 濃度

(2)

特開2001-66307

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 低比重リポ蛋白（LDL）、高比重リポ蛋白（HDL）、超低比重リポ蛋白（VLDL）、中間型リポ蛋白（IDL）、Lp（a）、小型かつ高密度のLDL（small, dense LDL）などのリポ蛋白が変性されてなる各種変性リポ蛋白と、他の血漿蛋白との複合体を測定対象とする血液中の変性リポ蛋白の検出方法。

【請求項2】 α 1-アンチトリプシン、フィブリノーゲン又はフィブリン（各々の分解産物を含む）、IqAもしくはフィブロンネクチンと各種変性リポ蛋白との複合体を測定対象とする請求項1に記載の変性リポ蛋白の検出方法。

【請求項3】 酵素免疫法、ラテックス凝集法、免疫発光分析法、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用いる請求項1または2に記載の変性リポ蛋白の検出方法。

【請求項4】 固相抗体として抗ヒト α 1-アンチトリプシン/リポ蛋白複合体中の α 1-アンチトリプシンを特異的に認識する抗体、抗ヒトフィブロンネクチン/リポ蛋白複合体中のフィブロンネクチンを特異的に認識する抗体、抗ヒトIqA/リポ蛋白複合体中のIqAを特異的に認識する抗体もしくは、抗ヒトフィブリノーゲン抗体を用い、標識抗体には測定対象に応じて酵素をはじめとする標識物質を標識した抗ヒトapo B 100抗体、抗ヒトapo A II抗体、抗ヒトapo E抗体、抗ヒトLp（a）抗体、抗ヒトapo C抗体、抗ヒトapo B 48抗体などの免疫反応検出試薬を用いる請求項2ないし3に記載の変性リポ蛋白の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、血液中に存在するLDL、HDL、VLDL、IDL、Lp（a）、Small, dense LDLなどのリポ蛋白の変性（特に酸化変性）リポ蛋白が α 1-アンチトリプシン、フィブリノーゲン又はフィブリン（各々の分解産物を含む）、IqAもしくはフィブロンネクチンと複合体を形成して存在することを見出すとともに、この点に着目した新規な変性リポ蛋白の検出方法に関するもので、動脈硬化性疾患やアルツハイマー病などの早期診断や治療上の薬効評価などに寄与せんとするものである。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】 動脈硬化症は大動脈、冠状動脈、脳動脈および肺動脈に多く発生し、心筋梗塞、脳梗塞などの主因となる疾患である。また、最近ではアルツハイマー病も動脈硬化症と関係性の大きい疾患であることがわかってきた。従来、血液中で、これらの生体内での動脈硬化症の状態を直接反映する測定対象がなく、血清中あるいは血漿中のLDL、Lp（a）、レムネントリポ蛋白、Small, dense LDL、酸化LDLなど、LDLを主体とした血管壁脂質蓄積と関わりが深い、動脈硬化性疾患に関わるリポ蛋白として測定されてきた。なかんず

く、酸化LDLと粥状動脈硬化病変の進展との関連性がスタインバーグ（Steinberg, D. et al. Engl. Med. 320: 915, 1989）により、一方、Rossらが提唱した傷害反応仮説（Ross, R. Nature. 362: 801, 1993）によって指摘されて以来、動脈硬化の進展における酸化LDLの関与が注目されてきた。

【0003】しかし、最近の研究では酸化LDLのみならず酸化HDL（Nakajima, T. et al. Biochem Biophys Biophys Res Commun. 217: 407, 1995）が動脈硬化症患部に局在する事案、大村らは（大村寛敏, 他. 動脈硬化. 25: No.4, 126, 1997）冠動脈硬化症において、血清HDL中の過酸化脂質量が增大しているのを認め、動脈硬化の形成にHDLの酸化変性も関与していることを報告している。同様に、簡素らは（簡美昌晃, 他. 動脈硬化. 24: 327, 1996）動脈内膜に酸化等による変性Lp（a）が沈着しているのを認め、Lp（a）の動脈硬化進展機序に変性Lp（a）の関与の可能性を示唆している。また最近の疫学調査では、アルツハイマー病の発症の背景には動脈硬化があることが指摘されており（Kalama, RN. Pharmacol & Ther. 72: 193, 1996）、リポ蛋白の酸化変性やapoEの表現型と動脈硬化症やアルツハイマー病の発症との関連が注目されている（Prem Kumar, DRD. et al. Am J Pathol. 148: 2083, 1996）。

【0004】即ち、活性酸素によりVLDLが酸化修飾されてヘパリン結合能を失い、凝集性の沈降を形成することによって脂質過酸化物が血管や神経組織に蓄積し、細胞を傷害することが予想されている（平村和行, 他. Jpn J Electroph. 42: 27, 1998）。最近までは、動脈硬化の発症進展に関して、LDLに関する生化学的、分子生物学的研究の進歩が大きく、酸化LDLがatherogenicityの主役であることが強調されすぎているきらいがある。しかし、近年の研究の成果として、上述のごとく動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展への関与物質として、LDLのみでなく、HDL、Lp（a）、VLDLなど多量の酸化変性リポ蛋白が含まれることが明らかとなった。

【0005】さらに、各リポ蛋白の被酸化性に大きな差があり、HDL、Lp（a）、Small, dense LDLは酸化され易く、粒子径の大きなLDLやVLDLは酸化されにくい特性を有することもわかってきた。また、LDLに分類されるsmall, dense LDLは糖尿病患者に多く出現するLDLであり、動脈硬化症全てを反映できないことも明らかとなった。そこで、LDLのみならず、特に被酸化性の強いHDLやLp（a）の酸化変性体にも注目する必要が生じてきた。

【0006】しかし、現状ではこれら各種リポ蛋白の変性体を血中で安易に測定する方法が存在しなかった。したがって、本研究は、動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展と深く関わる、各種変性リポ蛋白の新規な検出方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】 生体の主要な構成成分と

(3)

特開2001-86307

3

して蛋白質、脂質、糖質、核酸があげられるが、最も酸化されやすいのは脂質であり、酸化添加反応が起こり、いわゆる過酸化脂質が生成する。脂質が酸化されやすいのは多くの脂質がリノール酸やアラキドン酸のような高度不飽和脂肪酸のエステルとなっているためである。リポ蛋白質は脂質と蛋白質から構成されており、リポ蛋白質が酸化された場合には、脂質、蛋白質共に酸化変性を受ける。この生体脂質が非酵素的に酸化される引き金としては、活性酸素が考えられている。この過酸化脂質の測定は順相HPLC法などの分析化学的手法が用いられ、健康人の生体内でも確実に脂質の非酵素的酸化が起きていることが証明されている(山本順寛, 他, 蛋白質・核酸・酵素, 44: 1253, 1999)。

【0008】上述のごとく現状では、血液中の総過酸化脂質量の把握は可能であるが、リポ蛋白質個別の酸化変性度を知る方法は現在のところ存在せず、LDLの酸化変性体が血液中に存在することの裏証は、本発明者らの特願平8-317162号による方法によって初めて成された。さらに本発明者は、特願平11-109001号、特願平11-207913号に開示した手法によっても血液中の酸化変性LDLの検出が可能であることを発見した。

【0009】そして、その後、更なる研究と検討を繰り返した結果、循環血液中にLDL以外のリポ蛋白質の酸化変性体が存在する事実を発見して本発明に至った。即ち、特願平8-317162号、特願平11-109001号および、特願平11-207913号の手法を発展させて、血液中の各種リポ蛋白質の変性体を個別に測定可能な検出方法を確立して本発明を完成させたものである。

【0010】より具体的に説明すると、本発明は、各種リポ蛋白質(カイロミクロン、VLDL、IDL、LDL、Lp(a)、HDL)が酸化変性を受けると血漿蛋白(特に $\alpha 1$ -アンチトリプシンやフィブリノーゲン又はフィブリン(各々の分解産物を含む)、IgA、フィブロンectinなど)と複合体を形成し、且つ、いずれの複合体も動脈硬化症疾患と関連性が高い点を見出して完成されたものである。

【0011】なお典型的には、本発明は、各種酸化変性リポ蛋白質と $\alpha 1$ -アンチトリプシンの複合体を特異的に認識する抗体、各種酸化変性リポ蛋白質とIgAの複合体を認識する特異抗体、各種酸化変性リポ蛋白質とフィブロンectinの複合体を認識する特異抗体、もしくは、抗ヒトフィブリノーゲン抗体を固相抗体として用い、各種リポ蛋白質の酸化変性体と反応させた後に、酵素をはじめとする標識物をラベルした各種リポ蛋白質を構成するアポ蛋白に対する抗体を反応させて、血液中の酸化変性リポ蛋白質を分別測定する検出方法である。

【0012】この場合、血液中のリポ蛋白質を超速心法や化学物質を用いた沈澱法で分離したものを試料とすることも、血清や血漿をそのまま試料として測定することも可能である。リポ蛋白質を分離して試料とする場合は、固相抗体として抗ヒトIgA、抗ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン

4

ン、抗ヒトフィブロンectin抗体が使える。この検出方法によれば、生体内でフリーラジカル連鎖酸化反応が進行している状況を、各種リポ蛋白質の酸化状態として(HDL、Lp(a)、Small, dense LDLは特に易酸化性である)把握することが可能となる。また、この検出の臨床応用としては、動脈硬化症やアルツハイマー病の早期診断や、動脈硬化症治療薬投与時の薬効評価などに好適である。

【0013】

【実施例】以下、本発明について具体的に説明する。

【血清中あるいは血漿中の変性LDL/ $\alpha 1$ -アンチトリプシン複合体の測定】

1. IgG-O.AT-4モノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH8.0緩衝液に20 μ g/mlで溶解し、マイクロプレートに100 μ l/wellで分注する。
 2. 4℃で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1% ショ糖と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M, pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100 μ l/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250 μ l/wellで3回洗浄する。
 3. マイクロプレートに55 μ g/ml Mouse Gamma Globulin とRabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100 μ l/well1分注し、これに血清あるいは標準液を50 μ l添加する。
 4. 室温で一晩反応させる。
 5. 0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。
 6. ビオチン標識Fab'化IgG-apoB-427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6 μ g/mlとし、100 μ l/well分注する。
 7. 37℃下1.5時間反応させる。
 8. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。
 9. HRP標識アビジンD(Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 μ l/well分注する。
 10. 37℃下30分間反応させる。
 11. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。
 12. 発色試薬を100 μ l/well分注し、室温下30分間反応させる。
 13. 1Mリン酸水溶液を100 μ l/well分注し、反応を停止する。
 14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。
 15. 人工的に調整した変性LDL/ $\alpha 1$ -アンチトリプシン複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL/ $\alpha 1$ -アンチトリプシン複合体濃度を算出する。
- 【0014】【血清中あるいは血漿中の変性Lp(a)/ $\alpha 1$ -アンチトリプシン複合体の測定】
1. IgG-O.AT-4モノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH8.0緩衝液に20 μ g/mlで溶解し、マイク

10

20

30

40

50

(4)

特開2001-66307

5

6

ロプレートに100 μ l/wellで分注する。

2. 4℃下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1% ショ糖と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100 μ l/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250 μ l/wellで3回洗浄する。

3. マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma Globulin と Rabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100 μ l/well1分注し、これに血清あるいは標準液を50 μ l添加する。

4. 室温下一晩反応させる。

5. 0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

6. ビオチン標識Fab'化IgG-Lp(a)ポリクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6 μ g/mlとし、100 μ l/well1分注する。

7. 37℃下1.5時間反応させる。

8. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

9. HRP標識アビジンD (Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 μ l/well1分注する。

10. 37℃下30分間反応させる。

11. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

12. 発色試薬を100 μ l/well1分注し、室温下30分間反応させる。

13. 1Mリン酸水溶液を100 μ l/well1分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。

15. 人工的に調整した変性Lp(a)/ α 1-アンチトリブシン複合体により求めた検量線から試料中の変性Lp(a)/ α 1-アンチトリブシン複合体濃度を算出する。

【0015】〔血清中あるいは血漿中の変性HDL/ α 1-アンチトリブシン複合体の測定〕

1. IgG-OAT-4モノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl pH8.0緩衝液に20 μ g/mlで溶解し、マイクロプレートに100 μ l/wellで分注する。

2. 4℃下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1% ショ糖と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100 μ l/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250 μ l/wellで3回洗浄する。

3. マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma Globulin と Rabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100 μ l/well1分注し、これに血清あるいは標準液を50 μ l添加する。

4. 室温下一晩反応させる。

5. 0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

6. ビオチン標識Fab'化IgG-apoA1ポリクローナル抗体

を1%BSA溶液で1.6 μ g/mlとし、100 μ l/well1分注する。

7. 37℃下1.5時間反応させる。

8. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

9. HRP標識アビジンD (Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 μ l/well1分注する。

10. 37℃下30分間反応させる。

11. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

12. 発色試薬を100 μ l/well1分注し、室温下30分間反応させる。

13. 1Mリン酸水溶液を100 μ l/well1分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。

15. 人工的に調整した変性HDL/ α 1-アンチトリブシン複合体により求めた検量線から試料中の変性HDL/ α 1-アンチトリブシン複合体濃度を算出する。

【0016】〔血清中あるいは血漿中の変性VLDL/ α 1-アンチトリブシン複合体の測定〕

1. IgG-OAT-4モノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl pH8.0緩衝液に20 μ g/mlで溶解し、マイクロプレートに100 μ l/wellで分注する。

2. 4℃下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1% ショ糖と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100 μ l/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250 μ l/wellで3回洗浄する。

3. マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma Globulin と Rabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100 μ l/well1分注し、これに血清あるいは標準液を50 μ l添加する。

4. 室温下一晩反応させる。

5. 0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

6. ビオチン標識Fab'化IgG-apoEポリクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6 μ g/mlとし、100 μ l/well1分注する。

7. 37℃下1.5時間反応させる。

8. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

9. HRP標識アビジンD (Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 μ l/well1分注する。

10. 37℃下30分間反応させる。

11. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

12. 発色試薬を100 μ l/well1分注し、室温下30分間反応させる。

(5)

特開2001-66307

7

8

13. 1Mリン酸水溶液を100 μ l/well分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。

15. 人工的に調整した変性LDL/ α 1-アンチトリプシン複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL/ α 1-アンチトリプシン複合体濃度を算出する。

【0017】〔血清中の変性LDL/フィブリノーゲンまたはフィブリン（各々の分解産物を含む）複合体の測定〕

1. IgG-フィブリノーゲンポリクローナル抗体を0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH8.0緩衝液に20 μ g/mlで溶解し、マイクロプレートに100 μ l/wellで分注する。

2. 4℃下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1% ショ糖と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M, pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100 μ l/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250 μ l/wellで3回洗浄する。

3. マイクロプレートに55 μ g/ml Mouse Gamma Globulin と Rabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100 μ l/well 1分注し、これに血清あるいは標準液を50 μ l添加する。

4. 室温で一晩反応させる。

5. 0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

6. ビオチン標識Fab'化IgG-apoB-427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6 μ g/mlとし、100 μ l/well分注する。

7. 37℃下1.5時間反応させる。

8. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

9. HRP標識アビジンD (Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 μ l/well分注 *

*する。

10. 37℃下30分間反応させる。

11. 3.と同様、0.005%Tween20溶液250 μ l/wellで5回洗浄する。

12. 発色試薬を100 μ l/well分注し、室温下30分間反応させる。

13. 1Mリン酸水溶液を100 μ l/well分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。

15. 人工的に調整した変性LDL/フィブリノーゲン複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL/フィブリノーゲンまたはフィブリン（各々の分解産物を含む）複合体濃度を算出する。

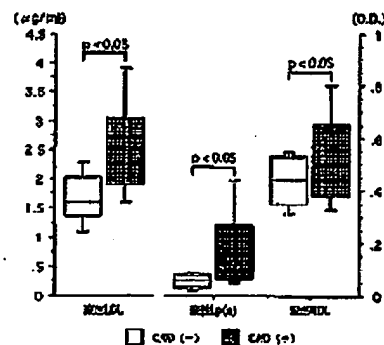
【0018】〔血清中の変性Lp(a)、変性HDL/フィブリノーゲンまたはフィブリン複合体の測定〕上述と同様にビオチン標識Fab'化抗体にLp(a)抗体、apoA1抗体を用いばよい。

【0019】〔冠動脈疾患における血中変性(LDL, Lp(a), HDL濃度)〕冠動脈造影検査により、1segmentに50%以上の有意狭窄病変を有するものを冠動脈硬化症と定め、これに基づき冠動脈硬化症と診断された者、CAD(+)群(n=26)、基準値以下のCAD(-)群(n=21)を対象に変性(LDLおよびLp(a)/ α 1-アンチトリプシン複合体、変性HDL/ α 1-アンチトリプシン複合体を測定し、比較検討したところ、いずれの変性リポ蛋白についてもCAD(+)群が有意な高値を示した(図1)。

【図面の簡単な説明】

【図1】冠動脈硬化症における血中の変性リポ蛋白(LDL, Lp(a), HDL)の濃度を図示したものである。

【図1】




冠動脈硬化症における血中の変性(LDL, Lp(a), HDL)濃度

METHOD FOR DETECTING DENATURED LIPOPROTEIN IN BLOOD

Publication number: JP2001066307 (A)

Also published as:

Publication date: 2001-03-16

 JP3491743 (B2)

Inventor(s): UCHIDA KAZUO; MASHIBA SHINICHI +

Applicant(s): IKAGAKU KK +

Classification:

- international: **G01N33/53; G01N33/92; G01N33/53; G01N33/92; (IPC1-7): G01N33/53**

- European:

Application number: JP19990244440 19990831

Priority number(s): JP19990244440 19990831

Abstract of JP 2001066307 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To detect various type denatured lipoprotein related to a crisis and an extension of an arteriosclerosis by adopting a composite of each of various type denatured lipoproteins and another plasma protein as an object to be measured. **SOLUTION:** In this method for detecting a denatured lipoprotein in blood, a specific antibody for recognizing composites of each of various type denatured lipoprotein and a plasma protein or particularly an α -antitrypsin, IgA, or fibronectin or an antihuman fibrinogen antibody is reacted with an oxidation denatured material of each lipoprotein as a solid phase antibody. After the reaction, the antibody is reacted with an apoprotein for constituting the lipoprotein labeled with a labeled material such as an enzyme or the like, and the oxidation denatured lipoprotein in the blood is fractionally measured.; If the lipoprotein in the blood is fractionated to a sample, an antihuman IgA, an antihuman α 1-antitrypsin, or an antifibronectin antibody is used as a solid phase antibody. Thus, the state that a free radical chain oxidation reaction is advanced in vivo can be grasped as a state of being oxidized of each lipoprotein, and is adapted to an early diagnosis of an arteriosclerosis or an Alzheimer's disease.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide